

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/063782 A1

- (51) 国際特許分類: C07H 1/00, 1/08, 13/06 (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019384
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-433717
2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 塩野義製薬株式会社 (SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西村 紳一郎 (NISHIMURA, Shinichiro) [JP/JP]; 〒0600008 北海道札幌市中央区北八条西 1 5 丁目 2 8-1 6 9 クリーンリバーフィネス桑園中央 1 5 0 1 号室 Hokkaido (JP). 武川 泰啓 (TAKEGAWA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒0650019 北海道札幌市東区北十九条東 1 丁目 1-2 4 足立ビル 2 0 7 号室 Hokkaido (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SYNTHESIS OF CORE SUGAR CHAIN STRUCTURE OF ASPARGINE-LINKED GLYCOPROTEIN

(54) 発明の名称: アスパラギン結合型糖タンパク質コア糖鎖構造の合成

(57) Abstract: It is intended to chemically synthesize the trisaccharide moiety at the reducing end in the core sugar chain structure of an asparagine-linked glycoprotein. By using a highly inexpensive natural polysaccharide having a mannose β -1,4-bond as the starting material, a β 1 \rightarrow 4 glycoside bond of mannose is formed.

(57) 要約: アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の 3 糖部分を化学的に合成する。非常に安価なマンノース β -1, 4-結合を有する天然多糖を出発原料として利用し、マンノースの β 1 \rightarrow 4 グリコシド結合を形成させる。



WO 2005/063782 A1

明 細 書

アスパラギン結合型糖タンパク質コア糖鎖構造の合成

技術分野

[0001] 本発明は糖鎖化学合成の分野に属し、詳細には糖タンパク質糖鎖を簡便に化学合成するための方法およびそのための中間体に関する。

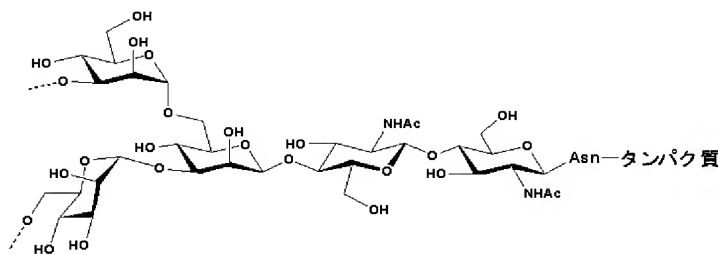
背景技術

[0002] 糖タンパク質は、糖鎖と呼ばれるオリゴ糖部分を有するタンパク質である。

近年、糖タンパク質が生体内で細胞接着や情報伝達などの生命現象に深く関わっていることが明らかにされつつあり、様々な生命現象を引き起こす糖鎖の構造が徐々にわかってきている。しかし、生体内で糖鎖が機能する上で発現する量は微量であり、糖鎖の化学的、物理的性質を解明するほどの量を純粋に得ることは非常に難しい。

糖タンパク質のひとつであるアスパラギン結合型糖タンパク質は人の血清中や卵白アルブミンなどに幅広く存在する。このアスパラギン結合型糖鎖は、糖鎖構造の分岐および構成糖の特徴から高マンノース型、複合型および混合型に分類される。これらの型はすべて、マンノース3分子、N-アセチルグルコサミン2分子からなる共通する5糖のコア糖鎖構造を糖鎖の還元末端側にもっている：

[化1]



アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造

そのため、上記式で示されるコア糖鎖構造を化学的に合成することがアスパラギン結合型糖鎖の機能を調べる上で研究の基礎となる。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0003] しかし、このアスパラギン結合型糖鎖のコア糖鎖構造を化学的に合成するための効率的な手法は未だ存在していない。その理由としては、コア糖鎖構造には化学的に合成する上で非常に困難な部分を含んでいることが挙げられる。

コア糖鎖構造の化学的合成において、マンノース β グリコシド結合構造、すなわち β -マンノグリコシド結合 (Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc) を化学的に形成させることは非常に困難である。マンノースの2位の水酸基がアキシアル型に結合しているため、隣接基効果を利用できないこと、また β -マンノグリコシド結合は、糖特有のアノマー効果に対して電氣的に不安定な構造をとることなどが、その理由である。非特許文献1には β -マンノグリコシド結合構造の化学的合成法が記載されているが、それは非常に複雑な工程を含み、時間およびコストを必要とする。

さらに、 β -マンノグリコシド結合 (Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc) の形成が困難である理由としては、グリコシル化反応時にアクセプターとなるN-アセチルグルコサミンの反応溶媒への溶解性が低いこと、また4位の水酸基の反応性が他の水酸基に比べて低いことが挙げられる(水酸基の反応性: 1位 \gg 6位 \gg 2位 $>$ 3位 $>$ 4位)。

また、アスパラギン結合型糖鎖のコア糖鎖構造を化学的に合成する際には、GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc構造の合成についても問題がある。

このようにアスパラギン結合型糖鎖のコア糖鎖構造を化学的に合成するには、特に還元末端の3糖 (Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc) の合成が、大きな問題として残っている。より効率的に、このコア糖鎖構造を合成するためには、特に β -マンノグリコシド結合を効率的に合成するという問題を解決しなければならない。

[0004] 非特許文献1: Kunz, H. and Gunther, W. (1988) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27, 1086-1087

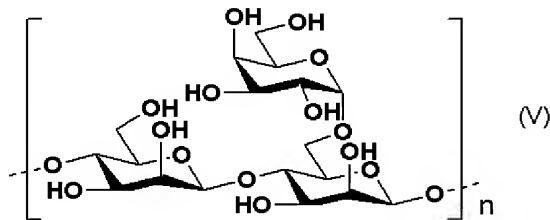
課題を解決するための手段

[0005] そこで、本発明者らはマンノース残基が β 1 \rightarrow 4結合で連なった構造を有する天然多糖、特にマンノース β -1, 4-結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよびマンナンに着目した。すなわち、本発明ではコア糖鎖構造の合成において最大の難関となる β -マンノグリコシド結合の形成を、天然多糖の構造中に含まれるMan β 1 \rightarrow

4Manの2糖を利用して行うという新合成手法を用いることにより克服し、コア糖鎖構造の効率的合成法を確立することを目的とする。

- [0006] すなわち、本発明は、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖(Man β 1 \rightarrow 4GlcN β 1 \rightarrow 4GlcN)を製造する方法において、
(1)マンノース β -1, 4-結合を有する多糖類、好ましくはマンノース β -1, 4-結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよびマンナン、さらに好ましくは、式(V):

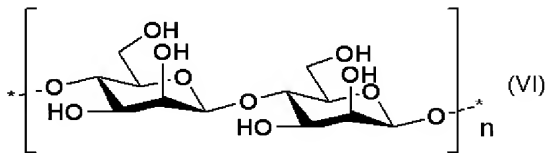
[化2]



(式中、nは50以上の整数)

で示されるガラクトマンナン誘導体、または、式(VI):

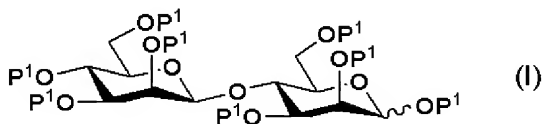
[化3]



(式中、nは50以上の整数)

で示されるマンナン誘導体、を加水分解し、次いで得られた化合物の水酸基を保護することにより、式(I):

[化4]



(式中、P¹は水酸基の保護基であり、波線はOP¹基がアキシアル配置もしくはエクソトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

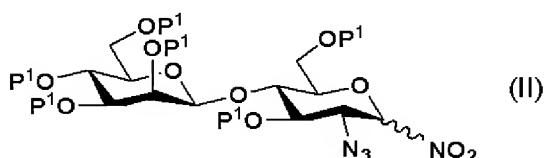
で示されるマンノース2糖 (ManP¹ β 1 \rightarrow 4ManP¹型) 化合物を製造する工程;

- [0007] (2) 得られたマンノース2糖 (ManP¹ β 1 \rightarrow 4ManP¹型) 化合物をハロゲン化し、次いで

還元することにより、マンノース2糖化合物における還元末端側のマンノースがグリカルに変換したグリカル化合物とし、次に、

(3) 得られたグリカル化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエクソトリアルに位置する式(II)：

[化5]



(式中、 P^1 は前記と同意義であり、波線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエクソトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

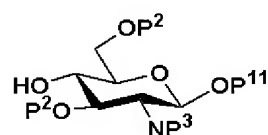
で示されるアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型) 化合物を製造する各工程；

[0008] (4) 得られたアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型) 化合物のニトロ基を脱離基に置換し、好ましくは

(4-1) 得られたアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型) 化合物のニトロ基を $-\text{OP}^{10}$ 基(式中、 P^{10} は水酸基の保護基)に置換し、 P^{10} を脱保護した後、トリハロアセトニトリルを反応させ、トリハロアセトイミデート体とするか、または(4-2) 得られたアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型) 化合物のニトロ基を脱離基で置換し、次いで

(5) 得られた脱離基導入体に式：

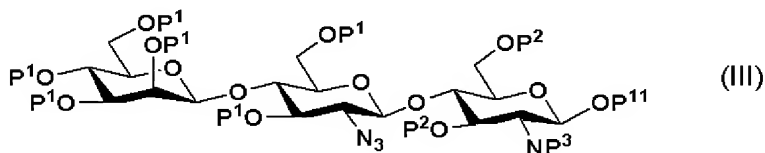
[化6]



(式中、 P^2 は水酸基の保護基、 P^3 はアミノ保護基、 P^{11} は水酸基の保護基である)

で示されるアミノ保護グルコピラノシドを反応させ、式(III)：

[化7]

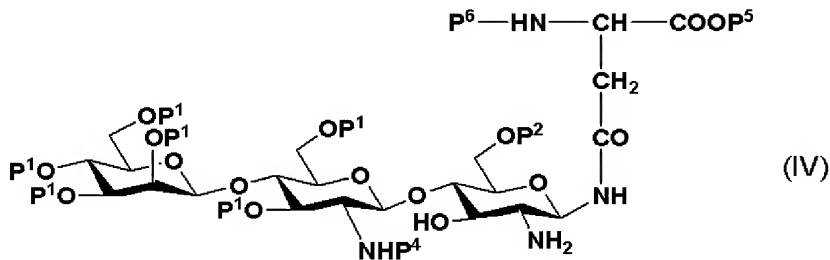


(式中、 P^1 、 P^2 、 P^3 および P^{11} は前記と同意義)

で示される3糖($\text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^2$ 型)化合物を製造する各工程:

[0009] (6) 得られた3糖化合物の還元末端に保護アスパラギンを結合させ、式(IV):

[化8]



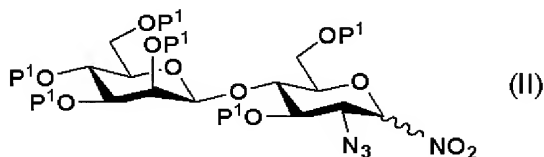
(式中、 P^1 および P^2 は前記と同意義、 P^4 および P^6 は各々独立してアミノ保護基、 P^5 はカルボキシ保護基である)

で示されるアスパラギン結合型3糖($\text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^2$)化合物を製造する工程:

を含む方法、およびそれぞれの工程にかかる方法、ならびに:

[0010] 本発明の方法に有用な合成中間体である式(II):

[化9]

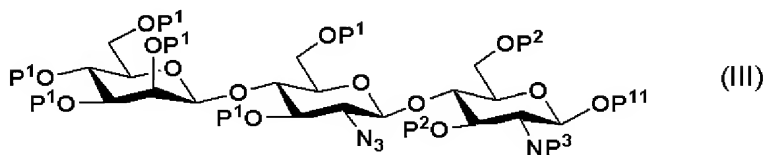


(式中、 P^1 は水酸基の保護基であり、波線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエクソリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型) 化合物、および

[0011] 式(III):

[化10]



(式中、 P^1 、 P^2 および P^{11} は水酸基の保護基、 P^3 はアミノ保護基である)

で示される3糖(Man β 1 \rightarrow 4GlcNP¹ β 1 \rightarrow 4GlcNP²型)化合物:に関する。

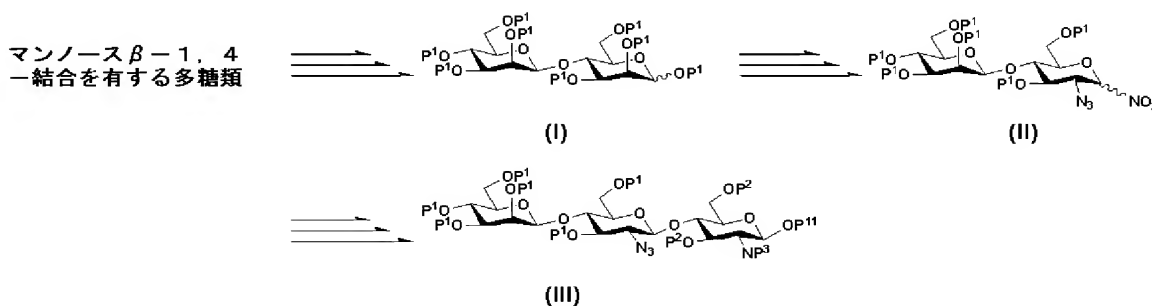
発明の効果

[0012] 本発明は、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖(Man β 1 \rightarrow 4GlcN β 1 \rightarrow 4GlcN)部分を簡便に合成できるので、様々な生命現象を引き起こすアスパラギン結合型糖タンパク質の機能および構造特性を解明するのに有用である。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 本発明のコア糖鎖構造の新合成手法の概略を示すと次のとおりになる:

[化11]



(式中、波線はOP¹基またはニトロ基が独立してアキシアル配置もしくはエクソトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

[0014] まず、マンノース β -1, 4-結合を有する多糖類を酸加水分解後、アセチル化を行い2糖である化合物(I) $\text{Man } \beta$ 1 \rightarrow 4 Man を得る。次に、これを化学的手法により還元末端側のマンノースをグリカルへ変換し、アジドナイトレーション反応を行い、化合物(II)に変換する。この還元末端側の2位にアジド基がエクソトリカルに位置する化合物(II)は、コア糖鎖構造の $\text{Man } \beta$ 1 \rightarrow 4 GlcNAc 部分へと変換できる有用な鍵中間体である。

このように、ガラクトマンナン、グアガムおよびマンナン誘導体から得られる化合物(I)から、コア糖鎖構造の中でも最も合成困難であるMan β 1 \rightarrow 4GlcNAc構造へ変換可能である中間体(II)が安価かつ大量かつ簡単に合成できる。さらに、この中間体(II)をグリコシルドナーとして利用することにより、コア糖鎖構造の還元末端の3糖(Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc)に容易に変換できる3糖構造の化合物(III)を合成することができる。

このようにして、非常に安価な天然多糖を利用することにより、コア構造の還元末端の3糖の合成を簡略化することに成功した。

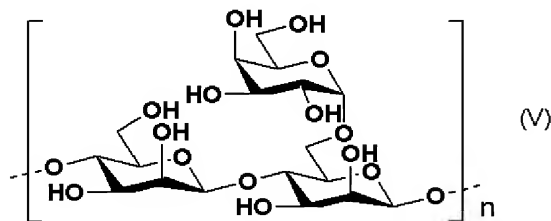
[0015] 次に本発明方法の各工程について詳細に説明する。

工程(1):

工程1はマンノース β -1, 4-結合を有する多糖類からマンノース2糖 (ManP¹ β 1 \rightarrow 4ManP¹型) 化合物(I)を製造する。まず、マンノース β -1, 4-結合を有する多糖類を加水分解し、次いで水酸基を保護し、そして目的の2糖を分離する。

出発原料であるマンノース β -1, 4-結合を有する多糖類としては、好ましくはマンノース β -1, 4-結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよびマンナンを使用し、さらに好ましくはさらに好ましくは、式(V):

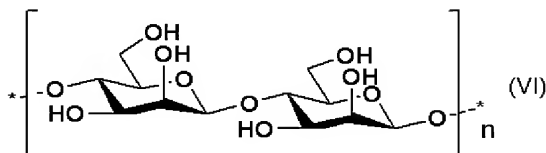
[化12]



(式中、nは50以上の整数)

で示されるガラクトマンナン誘導体、または、式(VI):

[化13]



(式中、nは50以上の整数)

で示されるマンナン誘導体を使用する。

[0016] ガラクトマンナン(galactomannan)誘導体(ガラクトマンノグリカン(galactomannoglycan)とも呼ばれる)は、マメ科植物の種子をはじめとし、アルファルファやクローバーの実などに広く存在する。グアール(guar, *Cyamopsis tetragonolobus*)やイナゴマメ(carobまたはlocust bean, *Ceratonia siliqua*)の実のガラクトマンナンは植物ガム製品として市販されている。

グアー種子から取れる「グアガム」は、マンノースが β 1 \rightarrow 4結合で連なった直鎖状の糖鎖にマンノース1残基毎にガラクトースが α 1 \rightarrow 6結合で分岐している天然多糖である。この物質の用途はほとんどが食品添加物であり、様々な缶詰製品の増粘剤として、食品の品質保持(型崩れ防止)や味の緩和剤として用いられており、簡単に入手可能かつ非常に安価である。

マンナン(mannan)誘導体は、D-マンノースから構成される多糖の総称である。ゾウゲヤシの種子胚乳、ラン科植物の球根などに含まれる植物マンナンはD-マンノース残基が β 1 \rightarrow 4結合で連なった直鎖構造を有し、水に難溶である。

これらは詳細には、「地域生物資源活用大辞典」 藤巻宏編 (1998) 農山漁村文化協会、Y. C. Lee, et al. (1977) Analytical Biochem., 79, 329-337 およびShiryo Yaga, et al. (1995) Mokuzai Gakkaishi, vol41, No 4, 440-443に記載されている。

マンノース β -1, 4-結合を有する多糖類の加水分解は通常、酸加水分解を行う。それには、通常、硫酸、好ましくは10-20%硫酸、トリフルオロ酢酸、硫酸-酢酸溶液を用い、反応温度は50-70℃が好ましい。

加水分解物中、70%エタノール可溶ガラクトマンナンを分離することにより、重合度「9」以上のものを除く。一般に、重合度が高くなれば、不溶画分に残る。

[0017] 水酸基の保護には通常、糖質化学の分野で利用されるアセチル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、ベンゾイル基、メトキシメチル基、テトラヒドロピラニル基、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基などである。

[0018] 2糖の分離は通常、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、および／または高速液体クロマトグラフィーにより行う。

[0019] 工程2:

工程2はマンノース2糖 (ManP¹ β 1 \rightarrow 4ManP¹型) 化合物(I)からグリカル化合物を製造する。まず、2糖化合物の還元末端側マンノースの1位をハロゲン化し、還元することによりグリカル化合物を製造する。

ハロゲン化は通常、ハロゲン化水素、酸ハロゲン化物等を用い、室温程度にて行う。還元は亜鉛等の金属を用いて行うが、高温は避ける。

[0020] 工程3:

工程3はグリカル化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエクソトリアルに位置するアジ化2糖化合物(II)を製造する。

アジドナイトレーション反応は、アジド化とニトロ化とを同時に反応させて行う。この反応により、エクソトリアルとアキシアルの混合物が生成されるので、それを分離精製することにより、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエクソトリアルに配置された化合物を得る。

[0021] 工程4:

工程4はアジ化2糖化合物のニトロ基を脱離基に置換する工程である。ここで使用する脱離基は、フッ素、臭素、塩素、トリクロロアセトイミデート、4-ペンテニル、アルキルチオ(硫黄)、アリールチオなどが一般的である。

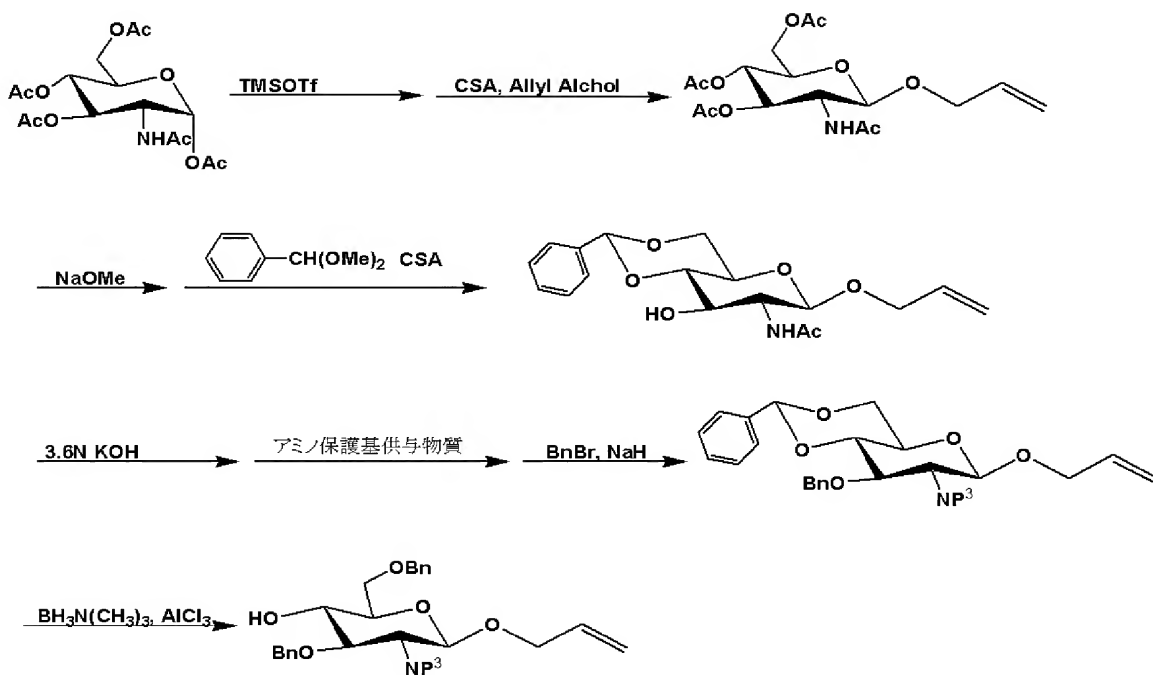
好ましくは、アジ化2糖化合物のニトロ基を $-OP^{10}$ 基(P^{10} は水酸基の保護基)に置換し、 P^{10} を脱保護した後、トリハロアセトニトリルを反応させ、トリハロアセトイミデート体とする。またはロゲン化水素を反応させてハロゲン体を得る。あるいは、 $-OP^{10}$ 体または P^{10} 脱保護体は、ペンテニル体、アセチルチオ体、アリールチオ体などの脱離基導入体へと常法により変換してもよい。

[0022] 工程5:

工程5は得られた脱離基導入体にアミノ保護グルコピラノシドを反応させ、3糖(Man β 1 \rightarrow 4GlcNP¹ β 1 \rightarrow 4GlcNP²型)化合物を製造する。

アミノ保護グルコピラノシドは次のスキームに従って製造できる。

[化14]



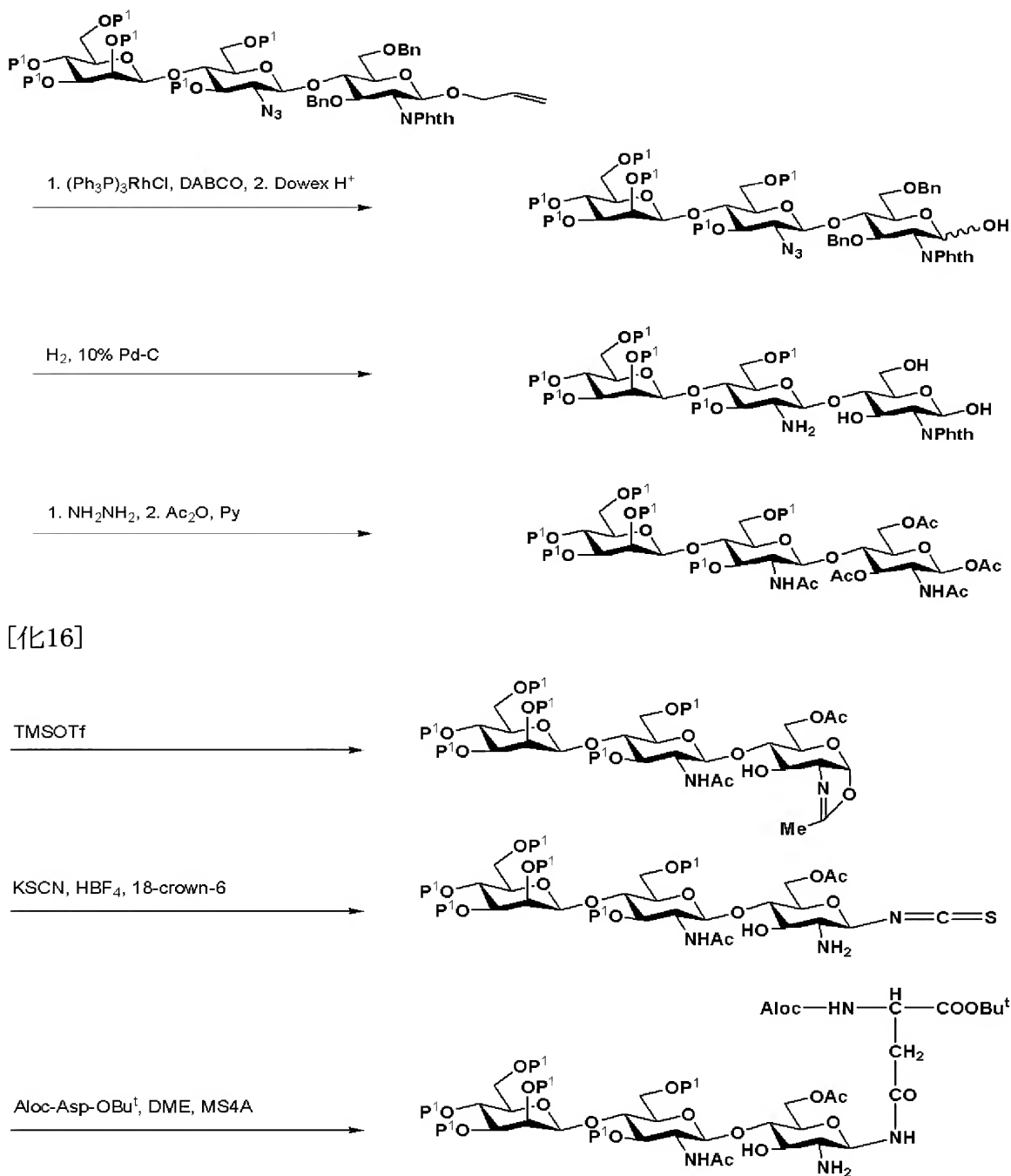
[0023] アミノ保護基: P^3 としては通常、フタルイミド基、tert-ブチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基などを利用する。

次いで、これを得られた脱離基導入体と酸性(ルイス酸性)条件下、反応させる。

[0024] 工程6:

工程6は、得られた3糖化合物にアスパラギンを結合させる。アスパラギンの結合は例えば、以下に示すスキームに従って行うことができる。

[化15]



[0025] 上記のようにして合成した3糖を、目的タンパク質のアスパラギン残基に導入し、さらに新たな糖を付加させてその糖鎖を伸長させることができる。さらにあらかじめ3糖に対して糖鎖を伸長させた後にタンパク質に導入することもできる。

あるいは、得られたアスパラギン結合型3糖のアスパラギンに、通常のペプチド合成化学を応用すれば、タンパク質を伸張させることができる。また、非還元末端のマンノ

ースに通常の糖質化学を応用すれば、糖鎖を伸張させることができる。

実施例

[0026] 以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例にて使用している試薬の入手先は次のとおりである。

・三晶株式会社(食品資材部)

グアガム(Guargum)MEYPROGAT 120S

・関東化学株式会社

亜鉛粉末(Zinc Powder)

硫酸銅5水和物(Copper(II)Sulfate Pentahydrate (結晶粉末)

セリウム(IV)ジアンモニウム ニトレート(Diammonium Cerium(IV) Nitrate)

[0027] ・和光純薬工業株式会社

酢酸ナトリウム(Sodium Acetate)

無水酢酸(Acetic Anhydride)

トリフルオロ酢酸(Trifluoroacetic Acid)

アジ化ナトリウム(Sodium Azide)

1,8-ジアザビシクロ[5, 4, 0]ウンデカ-7-エン(DBU、1,8-Diazabicyclo[5, 4, 0]undec-7-ene)

トリクロロアセトニトリル(CCl_3CN 、Trichloroacetonitrile)

ホウ素トリフルオリド ジエチルエーテルコンプレックス(BF_3OEt_2 、Boron Trifluoride Diethyl Ether Complex)

酢酸(Acetic Acid、有機合成用)

ピリジン(Pyridine、有機合成用)

テトラヒドロフラン(THF、Tetrahydrofuran、有機合成用)

ジクロロメタン(CH_2Cl_2 、Dichloromethane、有機合成用)

アセトニトリル(Acetonitrile、有機合成用)

酢酸エチル

クロロホルム

トルエン

無水MgSO₄

トリエチルアミン

[0028] ・東京化成株式会社(食品資材部)

臭化水素(30% HBr-AcOH, 30% Hydrogen Bromide in Acetic Acid)

[0029] ・ナカライテスク株式会社

ベンジルアミン(Benzylamine)

[0030] ・日本アルコール販売株式会社

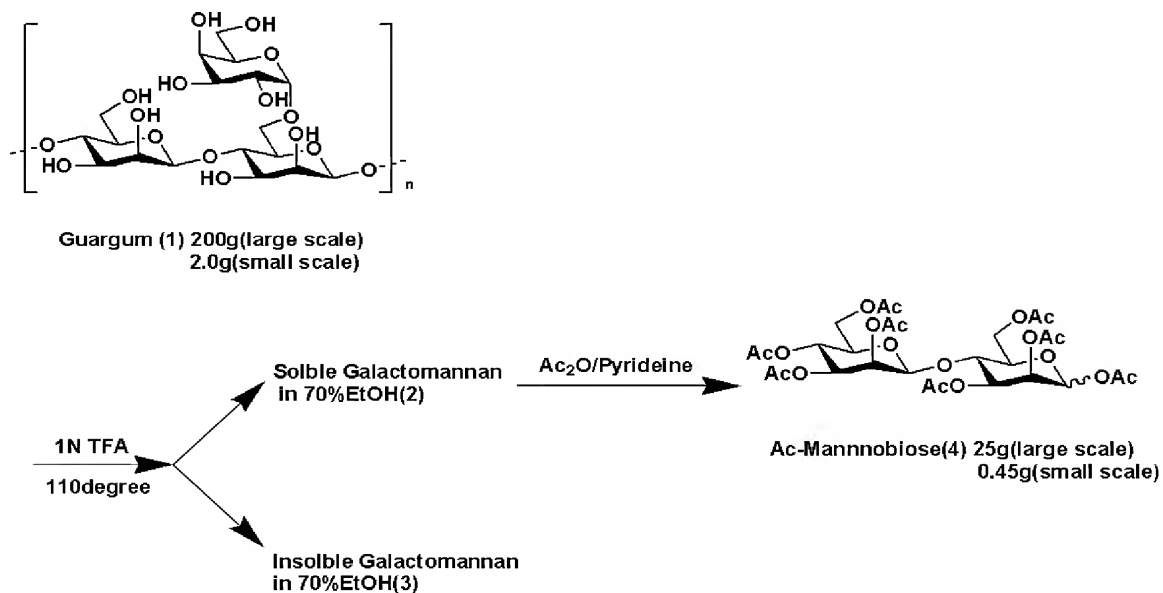
99% エタノール

[0031] 実施例1

1. グアガムの加水分解およびMan β 1 \rightarrow 4Manの単離

合成スキーム (1)

[化17]



[0032] 1. 1. グアガムの加水分解(少量スケール)

(A) グアガムをトリフルオロ酢酸(TFA)で酸加水分解し、70%エタノール可溶ガラクトマンナン(Galactomannan)を得る。

グアガム(1)2.0gを1N TFA 16.6mlに溶解させ、オイルバス中で110℃に加熱しながら、90分間スターラーを用いて攪拌した。反応溶液を、40mLの99%エタノールに加え

、室温で静置すると、白い粉末が沈殿してくるのでブフナー漏斗を用いてろ過を行い、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をトルエンで数回共沸させ、70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2) 2.26gと、70%エタノール不溶物のガラクトマンナン(3) 73mgを得た。

この70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2)をMALDI-TOFMSにより測定したところ重合度1から8まで分解されていることを確認した。

[0033] (B) 70%エタノール可溶のガラクトマンナンをアセチル化し、O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- β -D-マンノピラノシル)-(1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-テトラ-O-アセチル- α -and β -D-マンノピラノシド(4)を得る。

得られた70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2)2.26gをピリジン23mlに溶解させ、氷冷中で無水酢酸 23mlを加え、10°Cで22時間攪拌させた。反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO₃水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄をした後、無水MgSO₄を用いて乾燥させた。セライト濾過を用いてMgSO₄を取り除き、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル = 2:1)を用いて分離精製し、目的物(4)を450mg得た。

試料 α : β = 2:1 混合物; $[\alpha]_D$ -0.5 (c 0.012, クロロホルム); ¹H NMR δ (CDCl₃) 1.99~2.19 (all s, 24H, 8COCH₃), 3.64 (m, 1H, H-5'), 3.77 (m, 1/3H, H-5 β), 3.95~4.13 (m, 2+2/3H, H-5 α , H-4 β , H-4 α and H-6'b), 4.23~4.37 (m, 3H, H-6b β , H-6a α , H-6b α , H-6a' and H-6a β), 4.72 (d, 1/3H, $J_{1',2'}^{\beta}$ = 1.1Hz, H-1 β '), 4.75 (d, 2/3H, $J_{1',2'}^{\alpha}$ = 1.1 Hz, H-1 α '), 5.04 (m, 1H, H-3'), 5.17~5.25 (m, 2H, H-4', H-2 α and H-3 β), 5.39~5.45 (m, 2H, H-2', H-2 β and H-3 α), 5.81 (d, 1/3H, $J_{1,2}^{\beta}$ = 1.1 Hz, H-1 β), 6.03 (d, 2/3H, $J_{1,2}^{\alpha}$ = 2.0 Hz, H-1 α).

理論値(C₂₈H₃₈O₁₉として):C, 49.56; H, 5.64; 実測値:C, 49.34; H, 5.67

HR-FAB MS[M+Na]⁺計算値(C₂₈H₃₈O₁₉Naとして)701.191, 実測値 709.190

t.l.c ; Rf = 0.30 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

[0034] 1. 2. グアガムの加水分解(大量スケール)

(A)' グアガムをTFAで酸加水分解し、70%エタノール可溶のガラクトマンナンを得る。
。

グアガム(1) 200gを1N トリフルオロ酢酸(TFA) 1660mlに溶解させ、オイルバス中で110℃に加熱しながら、35分間メカニカルスターラーを用いて攪拌した。グアガムが懸濁したところで、15分間超音波破碎を行い、110℃下で、メカニカルスターラーを用いて80分間攪拌した。反応溶液を、氷水で冷却した後、4Lの99%エタノールに加えた。室温で静置すると、白い粉末が沈殿してくるのでブフナー漏斗を用いてろ過を行い、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をトルエンで数回共沸させ、70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2) 200.3gと、70%エタノール不溶物のガラクトマンナン(3) 9.9gを得た。

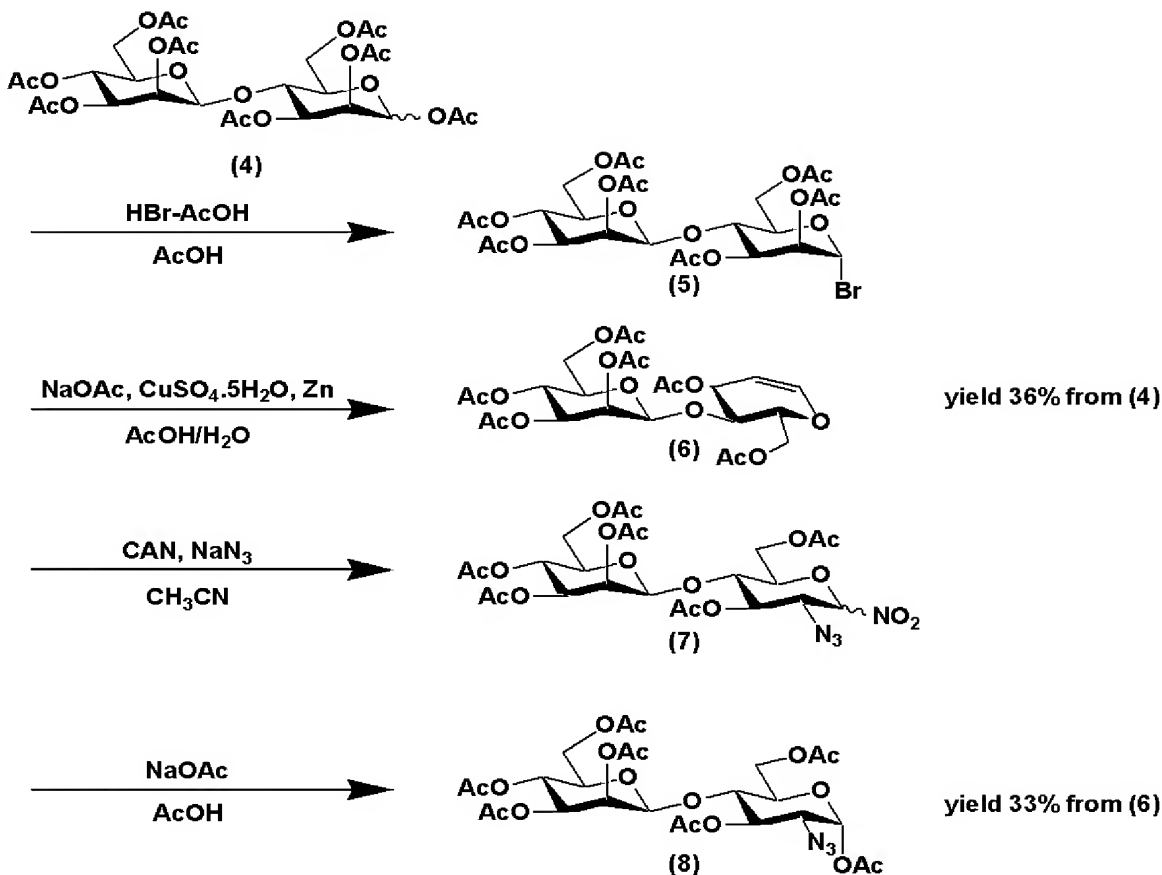
この70%エタノール可溶物のガラクトマンナン(2)をMALDI-TOFMSにより測定したところ重合度1から8まで分解されていることを確認した。

- [0035] (B)' 70%エタノール可溶のガラクトマンナンをアセチル化し、O-(2,3,4,6,-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,2,3,6,-テトラ-O-アセチル-α-and β-D-マンノピラノシド(4)を得る。

得られた70%エタノール可溶のガラクトマンナン (2)200.3gをピリジン2100mLに溶解させ、氷冷中で無水酢酸 2100mlを加え、10℃で22時間攪拌させた。反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO₃水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄をした後、無水MgSO₄を用いて乾燥させた。セライト濾過を用いてMgSO₄を取り除き、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル = 1:2)を用いて部分精製し、さらに中圧クロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル = 2:1)を用いて分離精製し、目的物(4)25.2gを得た。

- [0036] 2. O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,3,6-トリ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-α-D-グルコピラノシド(8)の合成
合成スキーム (2)

[化18]



[0037] (C) O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-2,3,6-トリ-O-アセチル-α-D-マンノピラノシル ブロミド (5)の合成

化合物(4)2.20gを酢酸 19mlに溶解させ、氷冷中で30% HBr-AcOHを4.6ml加え遮光しながら室温で150分間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO₃水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄した後に、無水MgSO₄で乾燥させた。セライトろ過を用いてMgSO₄を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮し、目的物(5)を含む反応混合物を2.21g得た。

t.l.c.; R_f = 0.35 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

[0038] (D)O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-,3,6-ジ-O-アセチル-D-グリコール(6)の合成

氷冷中で、酢酸 3.8ml、水 7.6ml、酢酸ナトリウム 2.06g、硫酸銅5水和物 0.20g、亜鉛 1.65gの順番で3つ口フラスコに、メカニカルスターラーを用いて攪拌しながら加えた。次に、化合物(5)を含む反応混合物を酢酸 7.6mlに溶かし、氷冷中で反応溶液に

加え、室温で遮光しながら4時間撹拌させた。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液をセライトろ過を用いて亜鉛を取り除き、ろ液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO₃水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄した後に無水MgSO₄で乾燥した。セライトろ過を用いてMgSO₄を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル = 2:1)を用いて分離精製し、目的物(6)を0.64g得た。

化合物(4)からの収率: 36%・

- [0039] ¹H NMR δ (CDCl₃) .200, 2.05, 2.08, 2.10, 2.12 and 2.17(all s, 18H, 6COCH₃), 3.66(ddd, 1H, J_{4',5'} = 9.8Hz, J_{5',6a'} = 5.8Hz, J_{5',6b'} = 12.2Hz, H-5'), 4.05(dd, 1H, J_{3,4} = 6.0Hz, J_{4,5} = 8.1Hz, H-4), 4.12(dd, 1H, J_{5',6b'} = 2.6Hz, J_{6a',6b'} = 12.2Hz, H-6b'), 4.13-4.17(m, 1H, H-5), 4.23(dd, 1H, J_{5,6b} = 5.3Hz, J_{6a,6b} = 12.2Hz, H-6b), 4.30(dd, 1H, J_{5',6a'} = 5.8Hz, J_{6a',6b'} = 12.2Hz, H-6a'), 4.42(dd, 1H, J_{5,6a} = 2.9Hz, J_{6a,6b} = 12.2Hz, H-6a), 4.79(dd, 1H, J_{1,2} = 6.1Hz, J_{2,3} = 3.1Hz, H-2), 4.86 (d, 1H, J_{1',2'} = 1.1Hz, H-1'), 5.05 (dd, 1H, J_{2',3'} = 3.4Hz, J_{3',4'} = 10.1Hz, H-3'), 5.22 (t, 1H, J_{4',5'} = 9.8Hz, H-4'), 5.45 (dd, 1H, J_{1',2'} = 1.1Hz J_{2',3'} = 3.4Hz, H-2'), 5.51 (m, 1H, H-3), 6.40 (dd, 1H, J_{1,2} = 6.1 Hz, J_{duble bond cis} = 1.2Hz, H-1)
- ¹³C NMR δ (CDCl₃) 20.5-21.0(m, 6COCH₃), 61.8(C-6), 62.5(C-6'), 65.9(C-4'), 68.5(C-3 and C-2'), 70.8(C-3'), 72.6(C-5'), 74.0(C-4), 74.4(C-5), 97.9(C-1'), 99.0(C-2), 145.6(C-1), 169.5-170.6(m, 6COCH₃)
- t.l.c.; Rf = 0.40 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

- [0040] (E)O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-3,6-di-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ α-and β-D-グルコピラノシル ニトレート (7)の合成

化合物(6) 510mgを脱水アセトニトリル 5.4mlに溶かし、-20℃に冷やし、スターラーで撹拌した。この溶液に、アジ化ナトリウム(NaN₃)89mgを加え、さらに、セリウム(IV)ジアンモニウム ニトレート 1.50gを15分毎に4回に分けて加えた。反応溶液をヘリウム雰囲気下、-20℃で18時間撹拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO₃水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥させた。セライトろ過を用いてMgSO₄を取り除き、ろ液を減圧下

で濃縮し、目的物(7)を含む残渣460mgを得た。

t.l.c.; Rf = 0.50 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

[0041] (F)O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,3,6-トリ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-α-D-グルコピラノシド(8)の合成

化合物(7)を含む反応混合物の残渣 460mgを酢酸 2.0mlに溶かし、酢酸ナトリウム 170mgを加え、80℃のオイルバス中で75分間撹拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO₃水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥させた。セライトろ過を用いてMgSO₄を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル = 3:2)を用いて分離精製し、目的物(8)とO-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,3,6-トリ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-α-D-マンノピラノシド(9)を含む残渣360mg得た。この混合物を少量のエタノールに熱しながら溶かし、氷水で冷やしながら結晶化させた。これにより、目的物(8)を 201mmg得た。

t.l.c.; Rf = 0.39 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

化合物(6)からの収率: 33%。

[0042] ¹H NMR δ (CDCl₃) 1.99, 2.05, 2.10, 2.12, 2.17 and 2.20 (all s, 21H, 7COCH₃), 3.51 (dd, 1H, J_{1,2} = 3.8Hz J_{2,3} = 10.5Hz, H-2), 3.61 (ddd, 1H, J_{4,5'} = 9.9Hz, J_{5',6a'} = 5.0Hz, J_{5',6b'} = 2.8Hz, H-5'), 3.83 (t, 1H, J_{4,5} = 10.2Hz, H-4), 3.99 (m, 1H, H-5), 4.12 (dd, 1H, J_{5',6b'} = 2.8Hz J_{6a',6b'} = 12.3Hz, H-6b'), 4.24 (dd, 1H, J_{5,6b} = 3.7Hz J_{6a,6b} = 12.5Hz, H-6b), 4.30 (dd, 1H, J_{5,6a} = 2.8Hz, J_{6a,6b} = 12.5Hz, H-6a) 4.38 (dd, 1H, J_{5,6a} = 2.8Hz, J_{6a,6b} = 12.5Hz, H-6a), 4.66 (d, 1H, J_{1',2'} = 0.6Hz, H-1'), 5.03 (dd, 1H, J_{2',3'} = 3.2Hz, J_{3',4'} = 9.9Hz, H-3'), 5.23 (t, 1H, J_{4',5'} = 9.9Hz, H-4'), 5.42 (dd, 1H, J_{1',2'} = 0.6Hz, J_{2',3'} = 3.2Hz, H-2'), 5.43 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.5Hz, J_{3,4} = 9.3Hz, H-3), 6.24 (d, 1H, J_{1,2} = 3.8Hz, H-1)

¹³C NMR δ (CDCl₃) 20.5-20.9(m, 6COCH₃), 60.3(C-2), 61.9(C-6), 62.2(C-6'), 65.8(C-4'), 68.1(C-2'), 69.7(C-3), 70.4(C-5), 70.7(C-3'), 72.5(C-5'), 74.0(C-4), 89.9(C-1), 97.5(C-1'), 168.6-170.4(m, 6COCH₃)

理論値($C_{26}H_{35}O_{17}$ として): C, 47.20; H, 5.33; N, 6.35; 実測値: C, 46.90; H, 5.32; N, 6.39.

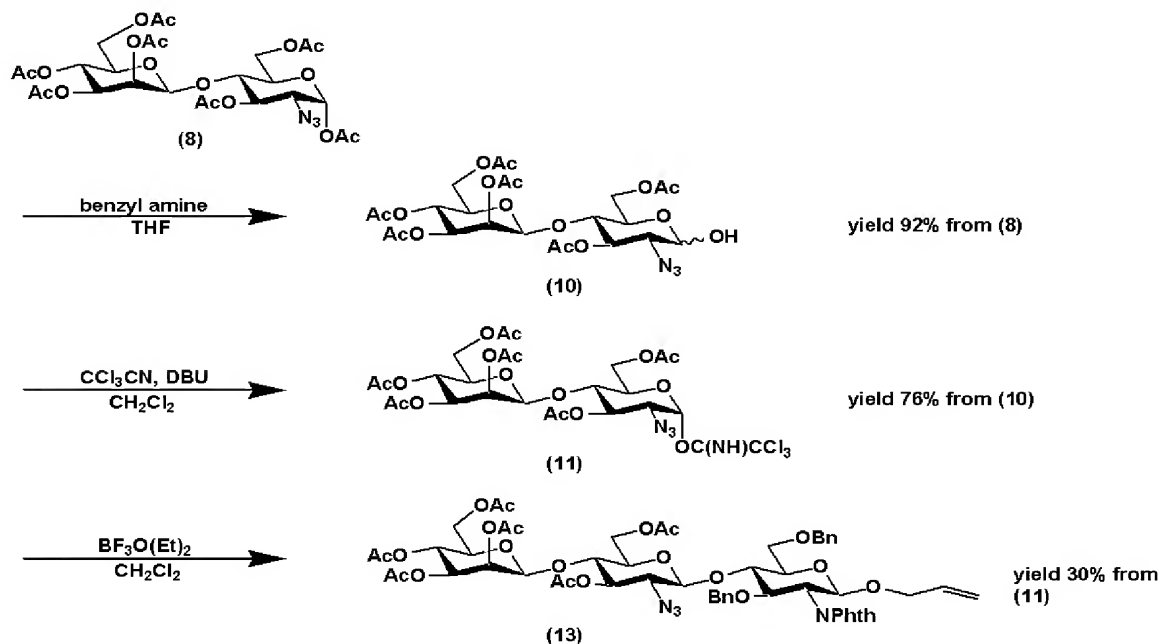
HR-FAB MS $[M+H]^+$ 計算値($C_{26}H_{36}N_3O_{17}$ として)662.205, 実測値 662.202

mp+183.5-184.0°C(エタノールから),

t.l.c.; Rf = 0.39 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

- [0043] 3. アリル O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-O-(3, 6-ジ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシド(13)の合成
合成スキーム (3)

[化19]



- [0044] (G) O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-3,6-ジ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-D-グルコピラノース (10)の合成

化合物(8)300mgをTHF 3.0mlに溶解させ、氷冷中でベンジルアミン 89 μ lを加え、室温で48時間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、1N.HCl水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄し、無水 $MgSO_4$ で乾燥させた。セライトろ過を用いて $MgSO_4$ を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル

＝3:2)を用いて分離精製し、目的物(10)を257mg得た。

化合物(8)からの収率：92%。

HR-FAB MS[M+H]⁺計算値(C₂₄H₃₄N₃O₁₆として)620.194;実測値 620.192。

t.l.c ; Rf = 0.26 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

- [0045] (H) O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-3,6-ジ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-α-D-グルコピラノシル トリクロロアセトイミデート(11)の合成

化合物(10)85mgをCH₂Cl₂ 550 μlとCCl₃CN 275 μlに溶解させ、氷冷中でDBU 10.2 μlを加え、室温で2時間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル = 2:1)を用いて分離精製し、目的物(11)を80mg得た。

化合物(10)からの収率：76%。

- [0046] ¹H NMR δ (CDCl₃) 1.97, 2.02, 2.07, 2.08, 2.16 and 2.17(all s, 18H, 6COCH₃), 3.56-3.60(m, 1H, H-5'), 3.60(dd, 1H, J_{1,2}=3.4Hz, J_{2,3}=10.5Hz, H-2), 3.88(t, 1H, J_{4,5}=9.8Hz, H-4), 4.09(dd, 1H, J_{5',6b'}=2.7Hz, J_{6a',6b'}=12.5Hz, H-6b'), 4.09-4.14(m, 1H, H-5), 4.21(dd, 1H, J_{5,6b}=3.9Hz, J_{6a,6b}=12.5Hz, H-6b), 4.33(dd, 1H, J_{5,6a}=2.2Hz, J_{6a,6b}=12.5Hz, H-6a), 4.33(dd, 1H, J_{5',6a'}=4.9Hz, J_{6a',6b'}=12.5Hz, H-6a'), 4.69(s, 1H, H-1'), 5.01(dd, 1H, J_{2',3'}=3.4Hz, J_{3',4'}=10.0Hz, H-3'), 5.20(t, 1H, J_{4',5'}=9.8Hz, H-4'), 5.38(d, 1H, J_{2',3'}=3.4Hz, H-2'), 5.51(dd, 1H, J_{2,3}=10.5Hz, J_{3,4}=9.5Hz, H-3), 6.41(d, 1H, J_{1,2}=3.4Hz, H-1), 8.79(s, 1H, NH)
- ¹³C NMR δ (CDCl₃) 20.5-20.7(m, 6COCH₃), 60.8(C-2), 61.9(C-6), 62.3(C-6'), 65.8(C-4'), 68.2(C-2'), 69.3(C-3), 70.7(C-5 and C-3'), 72.6(C-5'), 74.1(C-4), 90.5(C(NH)CCl₃), 94.1(C-1), 97.3(C-1'), 160.6(C(NH)CCl₃), 169.5-170.4(m, 6COCH₃)
- t.l.c ; Rf = 0.37 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

- [0047] (I) アリル O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-O-(3, 6-ジ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-O-ベンジル2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシド(13)の合成

化合物(11)47mgとアリル-O-3, 6-O-ジ-ベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシド(12)45mgをCH₂Cl₂ 700 μlに溶解させ、MS4 Å (モレキュラーシーブス)を70mg加え、窒素雰囲気下、-20℃で30分攪拌した。

次に、BF₃ OEt₂を2.3 μl加え、窒素雰囲気下、-20℃で24時間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、トリエチルアミン(TEA)を加え中和した後、セライトろ過を用いてMS4 Åを取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液;トルエン/酢酸エチル = 5:2)を用いて部分精製し、目的物(13)とアリル O-(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-O-(3, 6-ジ-O-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-α-D-グルコピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシドを含む残渣32mgを得た(α; β=1:2)。さらにHPLC(溶出液;ヘキサン/エタノール=12:1)を用いて分離精製し、目的物(13)を21mg得た。

化合物(11)からの収率: 31%。

- [0048] ¹H NMR δ (CDCl₃) 1.90, 1.92, 1.96, 2.00, 2.07, 2.15(all s, 18H, 6COCH₃), 3.08(m, 1H, H-5'), 3.27(dd, 1H, J_{1', 2'}=8.1Hz, J_{2', 3'}=10.2Hz, H-2'), 3.46(ddd, 1H, J_{4'', 5''}=9.9Hz, J_{5'', 6a''}=4.8Hz, J_{5'', 6b''}=2.6Hz, H-5''), 3.51-3.56(m, 1H, H-5), 3.56(t, 1H, J_{4', 5'}=9.8Hz, H-4'), 3.76(dd, 1H, J_{5, 6b}=1.4Hz, J_{6a, 6b}=10.9Hz, H-6b), 3.87(dd, 1H, J_{5, 6a}=2.9Hz, J_{6a, 6b}=10.9Hz, H-6a), 3.91(dd, 1H, J=6.3Hz, J=13.0Hz, CHH'CH=CH₂), 3.98-4.20(m, 7H, H-6b'', H-6b', H-4, H-2, H-6a', H-3, CHH'CH=CH₂), 4.27(dd, 1H, J_{5'', 6a''}=4.8Hz, J_{6a'', 6b''}=12.3Hz, H-6a''), 4.27 and 4.66(ABq, 2H, J=12.5Hz, PhCH₂), 4.30(d, 1H, J_{1', 2'}=8.1Hz, H-1'), 4.42 and 4.73(ABq, 2H, J=12.0Hz, PhCH₂), 4.45(s, 1H, H-1''), 4.76(dd, 1H, J_{2', 3'}=3.4Hz, J_{3', 4'}=9.9Hz, H-3'), 4.92(dd, 1H, J_{2'', 3''}=3.4Hz, J_{3'', 4''}=9.9Hz, H-3''), 4.93(dd, 1H, J=1.5Hz, J_{trans}=10.4Hz, CH=CH_{trans} H), 4.93(dd, 1H, J=1.5Hz, J_{cis}=17.2Hz, CH=CHH_{cis}), 5.06(d, 1H, J_{1,2}=8.4Hz, H-1), 5.14(t, 1H, J_{4'', 5''}=9.9Hz, H-4''), 5.30(d, 1H, J_{2'', 3''}=3.4Hz, H-2''), 5.60(m, 1H, CH=CH₂), 6.70-7.58(m, 14H, Ar-H)
- ¹³C NMR δ (CDCl₃) 20.5-20.6(m, 6COCH₃), 55.5(C-2), 62.2(C-6' and C-6''), 64.5(C-2'), 65.9(C-4''), 67.8(C-6), 68.1(C-2''), 69.7(CH₂CH=CH₂), 70.7(C-3''),

71.9(C-3'), 72.0(C-5'), 72.5(C-5''), 73.5 and 74.3(2PhCH₂), 74.6(C'-4 and C-5),
78.2(C-4), 97.3(C-1 and C-1''), 100.8(C-1'), 117.3(CH₂CH=CH₂), 127.0-133.7(m,
18Ar-C), 137.9(CH₂CH=CH₂), 169.6-170.4(m, 8C=O)

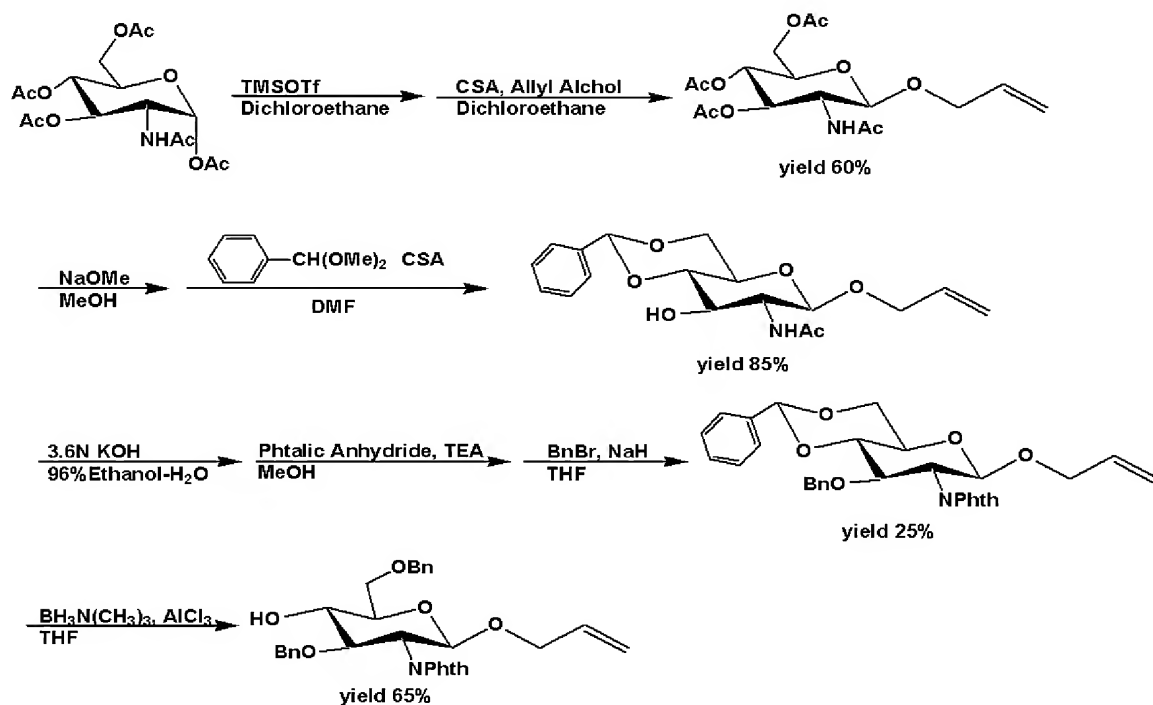
HR-FAB MS[M+Na]⁺計算値(C₅₅H₆₂N₄O₂₂Naとして).1153.375, 実測値 1153.374

t.l.c ; R_f = 0.53 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

[0049] (J) (グリコシル アクセプターデータ) アリル-O-3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-
フタルイミド-β-D-グルコピラノシド(12)

アミノ保護グルコピラノシド(12)を、次の合成スキームに従って製造した。

[化20]



¹H NMR δ (CDCl₃) 3.63(m, 1H, H-5), 3.76-3.85(m, 3H, H-4, H-6a and H-6b),
3.97(dd, 1H, J=13.1Hz, J=6.1Hz, CHH'CH=CH₂), 4.15-4.26(m, 3H, H-2, H-3 and
CHH'CH=CH₂), 4.52 and 4.73(ABq, 2H, J=12.2Hz, PhCH₂), 4.58 and 4.64(ABq,
2H, J=11.9Hz, PhCH₂), 4.99(dd, 1H, J=1.3Hz, J_{trans}=10.3Hz, CH=CH_{trans}H_{trans}),
5.07(dd, 1H, J=1.3Hz, J_{cis}=17.2Hz, CH=CH_{cis}H_{trans}), 5.17(d, 1H, J_{1,2}=8.1Hz, H-1),
5.61-5.70(m, 1H, CH=CH₂), 6.93-7.67(m, 14H, Ar-H)

¹³C NMR δ (CDCl₃) 55.3(C-2), 69.7(C-C=C), 70.7(C-6), 73.5(C-5), 73.8 and

74.3(Ph-C), 74.5(C-4), 78.7(C-3), 97.4(C-1), 117.3(C-C=C), 127.4-128.5(m, Ar-C), 133.6(C-C=C), 137.6 and 138.2(C=O)

HR-FAB MS[M+H]⁺計算値(C₃₁H₃₂NO₇として)530.218, 実測値 530.215

t.l.c ; Rf = 0.72 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

産業上の利用可能性

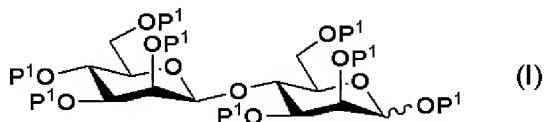
[0050] 糖鎖において糖を新たに付加して伸張させる場合、糖転移酵素を利用すれば簡便であるため、糖鎖の自動合成は通常、付加する糖とその糖を付加するための糖転移酵素が使用される。しかし、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖(Man β 1→4GlcN β 1→4GlcN)部分を作るための糖転移酵素は存在していない。従ってその合成は化学合成法に頼らざるを得ない。

本発明は、非常に安価な天然多糖であるマンノース β-1, 4-結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよび／またはマンナン誘導体を利用することによる、コア構造の還元末端3糖の簡便な合成方法である。

請求の範囲

- [1] (1) マンノース β -1, 4-結合を有する多糖類を加水分解し、次いで得られた化合物の水酸基を保護することにより、式(I):

[化1]

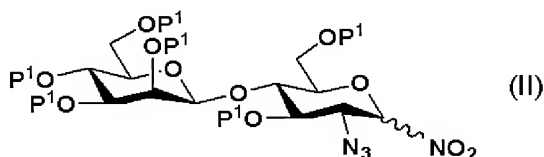


(式中、 P^1 は水酸基の保護基であり、波線は OP^1 基がアキシアル配置もしくはエクソトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるマンノース2糖 ($ManP^1 \beta 1 \rightarrow 4ManP^1$ 型) 化合物を製造する工程を含む、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖 ($Man \beta 1 \rightarrow 4GlcN \beta 1 \rightarrow 4GlcN$) を製造する方法。

- [2] アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖 ($Man \beta 1 \rightarrow 4GlcN \beta 1 \rightarrow 4GlcN$) を製造する請求項1記載の方法において、さらに、
- (2) 得られたマンノース2糖 ($ManP^1 \beta 1 \rightarrow 4ManP^1$ 型) 化合物をハロゲン化し、次いで還元することにより、マンノース2糖化合物における還元末端側のマンノースがグリカルに変換したグリカル化合物とし、次に、
- (3) 得られたグリカル化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエクソトリアルに位置する式(II):

[化2]



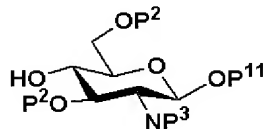
(式中、 P^1 は前記と同意義であり、波線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエクソトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖 ($ManP^1 \beta 1 \rightarrow 4ManP^1$ 型) 化合物を製造する、各工程を含む方法。

- [3] アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖

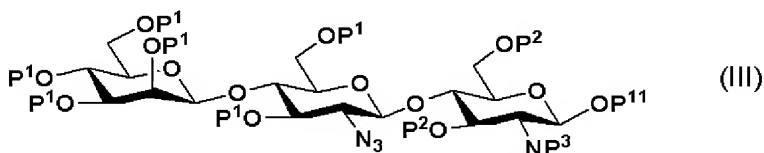
- (Man β 1 \rightarrow 4GlcN β 1 \rightarrow 4GlcN)を製造する請求項2記載の方法において、さらに、
 (4) 得られたアジ化2糖 (ManP¹ β 1 \rightarrow 4ManP¹型) 化合物のニトロ基を脱離基に置換し、
 次いで
 (5) 得られた脱離基導入体に式:

[化3]



- (式中、P²は水酸基の保護基、P³はアミノ保護基、P¹¹は水酸基の保護基である)
 で示されるアミノ保護グルコピラノシドを反応させ、式(III):

[化4]

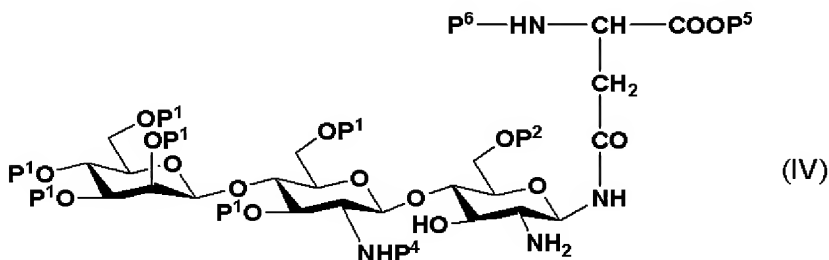


- (式中、P¹、P²、P³およびP¹¹は前記と同意義)

で示される3糖(Man β 1 \rightarrow 4GlcNP¹ β 1 \rightarrow 4GlcNP²型)化合物を製造する、各工程を含む方法。

- [4] アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖
 (Man β 1 \rightarrow 4GlcN β 1 \rightarrow 4GlcN)を製造する請求項3記載の方法において、さらに、
 (6) 得られた3糖化合物の還元末端に保護アスパラギンを結合させ、式(IV):

[化5]



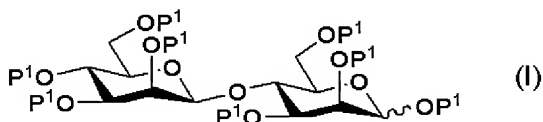
- (式中、P¹およびP²は前記と同意義、P⁴およびP⁶は各々独立してアミノ保護基、P⁵はカルボキシ保護基である)

で示されるアスパラギン結合型3糖(Man β 1 \rightarrow 4GlcNP¹ β 1 \rightarrow 4GlcNP²)化合物を製造

する方法。

- [5] マンノース β -1, 4-結合を有する多糖類を加水分解し、次いで得られた化合物の水酸基を保護することにより、式(I):

[化6]

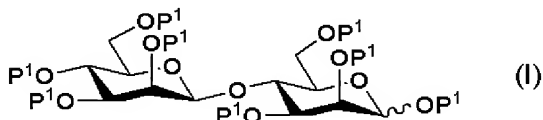


(式中、 P^1 は水酸基の保護基であり、波線は OP^1 基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるマンノース2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{ManP}^1$ 型) 化合物を製造する方法。

- [6] 式(I):

[化7]

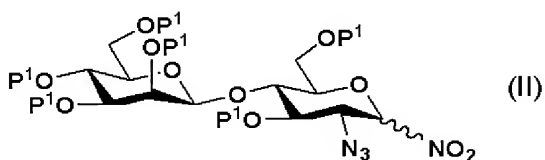


(式中、 P^1 は水酸基の保護基であり、波線は OP^1 基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるマンノース2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{ManP}^1$ 型) 化合物をハロゲン化し、次いで還元することにより、マンノース2糖化合物における還元末端側のマンノースがグリカルに変換したグリカル化合物とし、次に、

得られたグリカル化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエカトリアルに位置する式(II):

[化8]

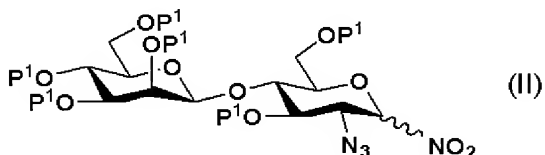


(式中、 P^1 は前記と同意義であり、波線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{ManP}^1$ 型) 化合物を製造する方法。

[7] 還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエクソトリアルに位置する式(II) :

[化9]

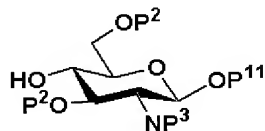


(式中、 P^1 は前記と同意義であり、波線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエクソトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{ManP}^1$ 型) 化合物のニトロ基を脱離基に置換し、次いで

得られた脱離基導入体に式:

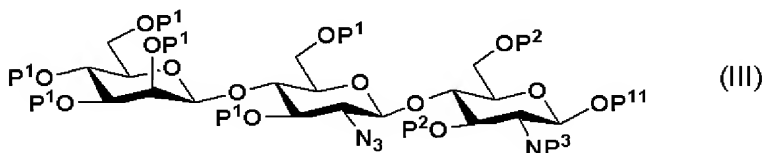
[化10]



(式中、 P^2 は水酸基の保護基、 P^3 はアミノ保護基、 P^{11} は水酸基の保護基である)

で示されるアミノ保護グルコピラノイドを反応させ、式(III) :

[化11]

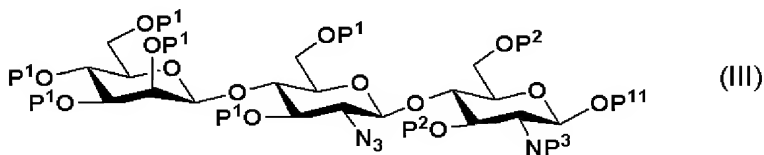


(式中、 P^1 、 P^2 、 P^3 および P^{11} は前記と同意義)

で示される3糖 ($\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNP}^2$ 型) 化合物を製造する方法。

[8] 式(III) :

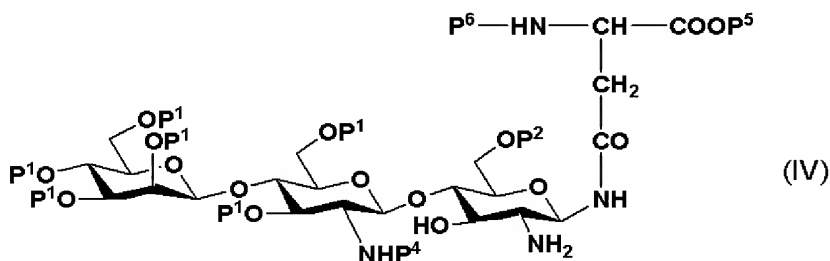
[化12]



(式中、 P^1 、 P^2 、 P^3 および P^{11} は前記と同意義)

で示される3糖化合物の還元末端に保護アスパラギンを結合させ、式(IV)：

[化13]

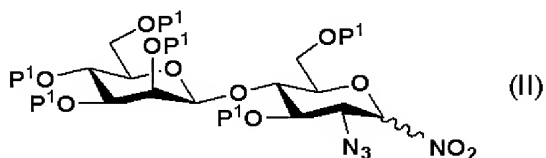


(式中、 P^1 および P^2 は前記と同意義、 P^4 および P^6 は各々独立してアミノ保護基、 P^5 はカルボキシ保護基である)

で示されるアスパラギン結合型3糖($\text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^2$)化合物を製造する方法。

[9] 式(II)：

[化14]

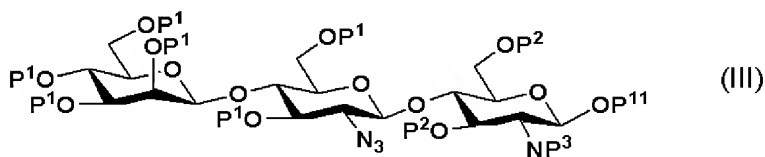


(式中、 P^1 は水酸基の保護基であり、波線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエクソリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖 ($\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型) 化合物。

[10] 式(III)：

[化15]



(式中、 P^1 、 P^2 および P^{11} は水酸基の保護基、 P^3 はアミノ保護基である)

で示される3糖($\text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^2$ 型)化合物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07H1/00, 1/08, 13/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07H1/00, 1/08, 13/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	BOLAM, David N. et al., Synthesis of 2,4-dinitrophenylglycosides of D-xylobiose and D-mannobiose., Carbohydrate Research, 1998, Vol.312, pages 85, 89	5 1-4, 6-10
A	JP 2001-524484 A (Advanced Medicine East, Inc.), 04 December, 2001 (04.12.01), Page 103, line 3 to page 105, line 16; Fig. 15 & WO 1999/026956 A1 & US 6114309 A & US 6207820 B1 & US 6274716 B1 & EP 1047703 A1	1-10
A	GUNTHER, Von Wolfgang et al., Synthese eines β-Mannosyl-Chitobiosyl-Asparagin-Kojugates - eines zentralen Elements der Core-Region von N-Glycoproteinen., Angewandte Chemie, 1990, Vol.102, No.9, pages 1068, 1069	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 March, 2005 (11.03.05)

Date of mailing of the international search report
29 March, 2005 (29.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019384

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As the results of the international search, it is clarified that a process for producing the compound represented by the formula (I) by hydrolyzing a polysaccharide and then protecting a hydroxyl group in the thus obtained compound is not novel.

Thus, there is no technical features, which are the same or correspond to each other, among the inventions as set forth in claims 1, 5 and 6.

It appears that there is no other technical feature common to the inventions as set forth in claims 1, 5 and 6 and claims 2 to 4 or 6 to 10.

Such being the case, the present international application has two or more invention groups.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07H1/00, 1/08, 13/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07H1/00, 1/08, 13/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	BOLAM, David N. et al., Synthesis of 2,4-dinitrophenyl glycosides of D-xylobiose and D-mannobiose. Carbohydrate Research, 1998, Vol.312, pages 85 and 89	5 1-4, 6-10
A	J P 2001-524484 A (アドバンスド メディシン イースト, インク.) 2001. 12. 04, 第103頁第3行-第105頁第16行, 第15図 & WO 1999/026956 A1 & US 6114309 A & US 6207820 B1 & US 6274716 B1 & EP 1047703 A1	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 03. 2005

国際調査報告の発送日

29.03.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

関 政立

4 C

3 5 4 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	GUNTHER, Von Wolfgang et al., Synthese eines β -Mannosyl- Chitobiosyl-Asparagin-Konjugates - eines zentralen Elements der Core-Region von <i>N</i> -Glycoproteinen. Angewandte Chemie, 1990, Vol.102, No.9, pages 1068 and 1069	1 - 1 0

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際調査の結果、多糖類を加水分解し、次いで得られた化合物の水酸基を保護することによる式（I）で示される化合物の製造方法は、新規でないことが明らかとなった。

してみると、請求の範囲1、5及び6に記載の発明の間に、同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

また、他に、請求の範囲1、5、6及び2－4若しくは6－10に記載の発明の間に共通する技術的特徴は認められない。

よって、この国際出願は二以上の発明を包含する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。